

RADOVI

KNJIGA LXII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 20.

Urednik

SEID HUKOVIĆ,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine



Sarajevo
1977.

SEID HUKOVIĆ**, BRANKO GRINFELD I DŽELAL SERDAREVIĆ

UTICAJ MIKOTOKSINA NA NEUROMIŠIČNU TRANSMISIJU*

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 13. I 1977. godine)

Apstrakt: Neurotoksin, penitrem A, koji se stvara kod raznih gljivica sa hrane ima tremorogena i konvulzivna djelovanja. Efekt penitrem A na izoliranom inerviranom ezofagusu izaziva povećanje stimulacije ezofagealnih, somatskih nerava miša i štakora. Efekt stimulacije adrenergičnih i holiner-gičnih nerava duktus deferensa i mokraćnog mjehura miša pod uticajem Penitrem A je smanjenje izazvanih kontrakcija, dok je na organima štakora registrovano povećanje izazvanih kontrakcija autonomnih organa i nerava. Mehanizam djelovanja na diafragmi štakora vjerovatno je sličan djelovanju na ezofagusu štakora i miša, gdje dolazi do povećanja oslobađanja i osjetljivi-vosti prema acetilholinu. Na drugim ispitivanim organima mehanizam dje-lovanja je različit, zavisno od vrste životinja.

Gljivice mogu ostaviti u hrani opasne mikotoksine (Lindner, 1974; Sapeika, 1974; Cole et al., 1974; Ožegović 1971). Micelije od nekih gljivica *Aspergillus flavus* i *Penicillium cyclopium* — *viridicatum* grupa sadrže otrove koji izazivaju tremor i konvulzije ako se injiciraju eksperi-mentalnim životinjama u dozi od 270 µg/kg (Stern, 1971; Wilson et. al., 1972). Veće doze 2,5 mg/kg do vode do kliničko-toničkih grčeva i smrti živo-tinje, ukoliko se injiciraju ili daju per nos. Neuromikotoksin iz pomenutih gljivica zove se ciklopijum toksin ili penitrem A (Wilson et al., 1972). Pe-nitrem A nije samo neurotoksin, on pokazuje također nefrotoksična djelo-vanja, urin otrovanih životinja sadrži abnormalne količine elektrolita i glu-koze (Wilson et al., 1968).

Analiza toksičnog djelovanja penitrema A je vršena, osim na čitavoj životinji, još na izoliranoj hemidijafragmi štakora. Elektrofiziološkom opser-

* Ovaj rad je finansiran zajedničkim sredstvima (Grant 02-613-4) FDA, Rockville, SAD i Zajednice za nauku BiH, Sarajevo, Jugoslavija.

** Institut za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu.

vacijom nađeno je više mehanizama i mjesta djelovanja otrova, kao npr. povećano lučenje transmittora, povećana osjetljivost postsinaptičke membrane, pre — i postsinaptičko djelovanje. Cilj ovoga rada je analizirati djelovanje penitrem A na neuromišićnoj transmisiji tri izolirana inervirana organa. Pomenuta tri organa su model-sistemi za tri vrste neuromišićne transmisije, za tri organska sistema i za dva tipa mišića. Pretpostavka je da će penitrem A izazvati snažne promjene neuromišićne transmisije na periferiji, koja će biti u korelaciji sa izrazitim centralnim efektima.

METODA

Za eksperimente su uzimani organi štakora (80% maksimalne težine) i miševa, u prosjeku teških 25 g. Životinje se ošamute dekapitiraju i rasijeku po medijalnoj liniji. Preparacija mokraćnog mjehura se vrši na taj način što se podveže jedan ureter pola centimetra od ulaska u mjehur i sve se isiječe na visini uretre, te tako izvadi organ iz životinje (Huković et. al., 1965). Ezofagus se preparira na taj način što se prvo identificiraju nervi koji ulaze u organ, podvežu i presijeku disalno od mjesta vezivanja (Stern und Huković, 1966). Duktus deferens se preparira na taj način što se nervi sa nešto tkiva odvoje, podvežu i skupa sa organom isprepariraju (Huković, 1961). Mišićni dio organa se veže za izometrični transducer koji registruje pokrete na mikrodinamometru. Nervi se uvlače u bipolarnu platinsku elektrodu. Električni stimulus se aplicira svake minute u trajanju od 5 sek., jačine 2 mA, 10 Hz i 1 mS.

Organ sa nervom je suspendiran u posudu za izolirane organe koja sadrži 20 ml Tyrodeove otopine zagrijane na 32°C i gasirane sa karbogenom. Posuda se ispire svježom otopinom, najmanje dva puta poslije aplikacije supstance, ili svakih 10 minuta. Supstanca se ostavlja u kontaktu sa organom 6 minuta. Visina kontrakcija se mjeri u odnosu na visinu kontrolnim kontrakcija. Ukoliko se radi o promjenama koje se mjere od kontrolne bazalne linije, te promjene se nazivaju apsolutne kontrakcije. Ukoliko se mjeri od nove bazalne linije, onda se promjene nazivaju relativne kontrakcije.

REZULTATI

Efekti električne stimulacije nerava

Električna stimulacija nerava sa konstantnim stimulusima izaziva podjednake kontrakcije. Vrlo mali pad visine dvije susjedne kontrakcije, manji od 1%, omogućava da se primijete promjene koje su jako male i koje na drugi način nije moguće registrovati.

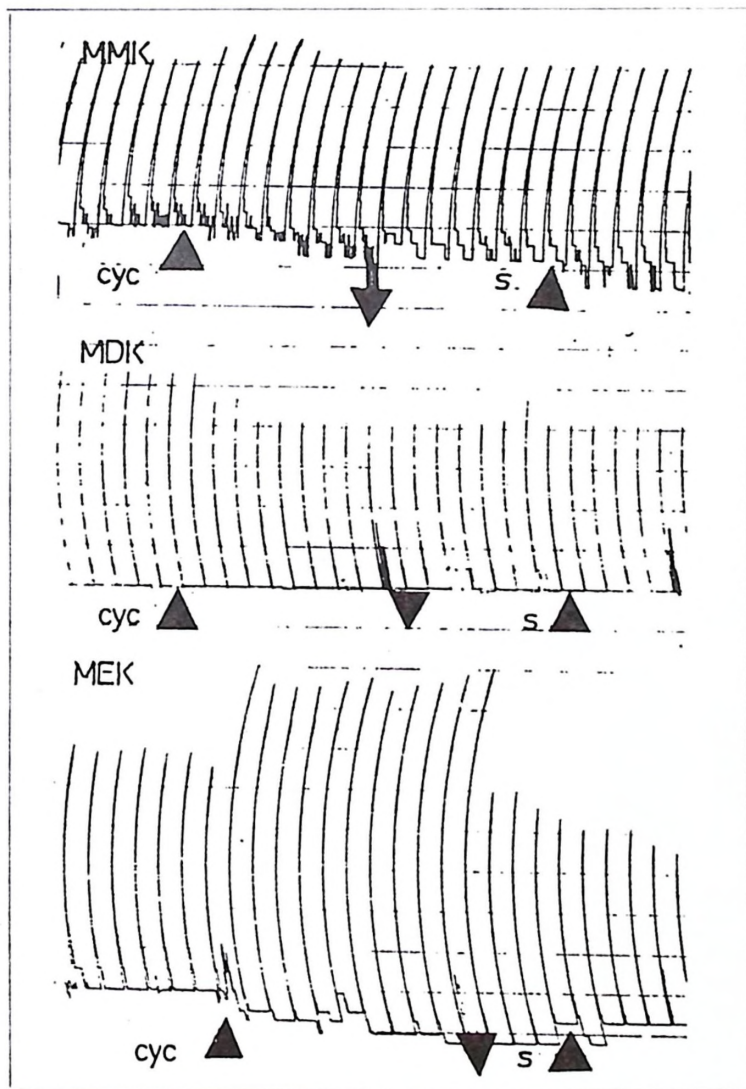
Efekti penitrema A

Djelovanje penitrema A ispitivano je u dvije koncentracije na tri organa uzeta od dvije vrste životinja. Zavisno od doze i organa, kao i od vrste živo-

tinje, penitrem A izaziva povećanje, smanjenje ili dvofazni efekt. Penitrem A je dobiven od Wilsona B. J., na čemu se zahvaljujemo. Otapan je u propilen glikolu.

Djelovanja penitrema A na mokraćni mjehur

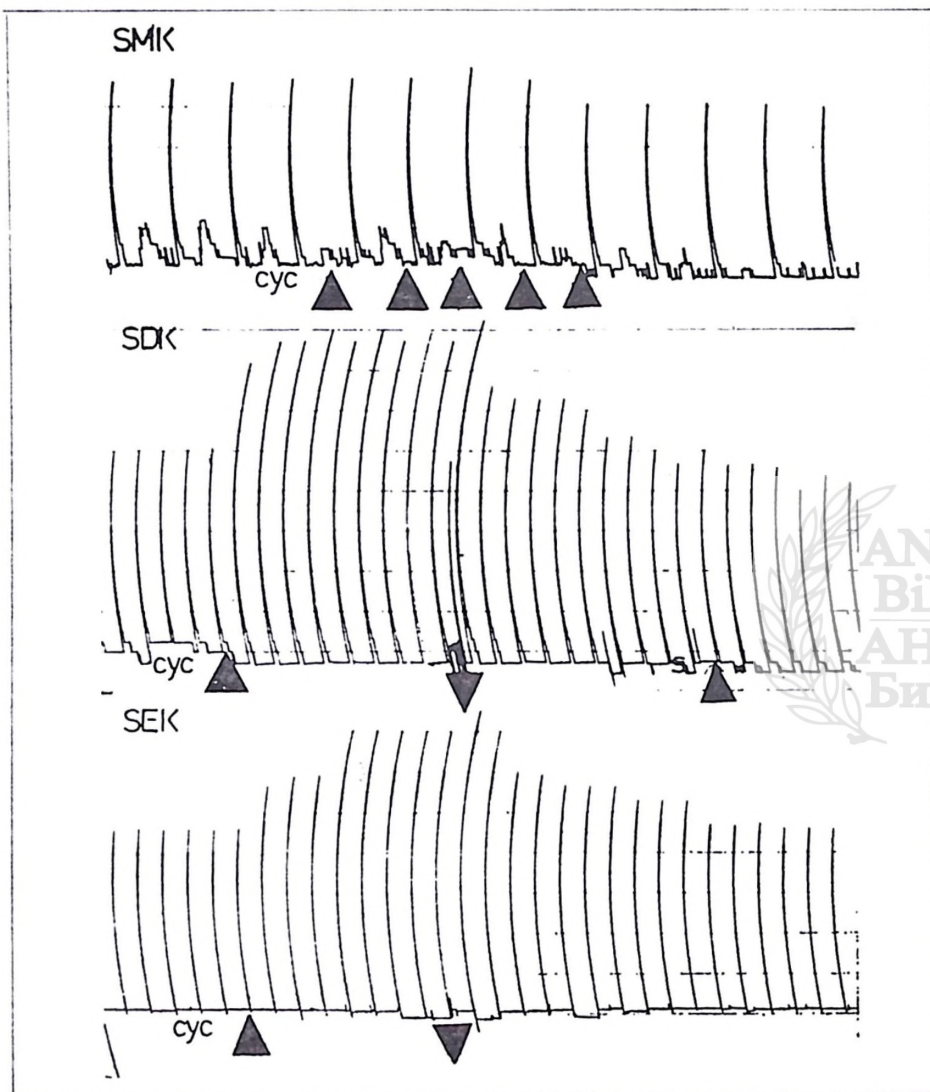
Penitrem A u koncentraciji 2 $\mu\text{g/ml}$ smanjuje efekt stimulacije holinergičnog nerva mokraćnog mjehura miša u 8/16 slučajeva. U istoj dozi povećava efekt stimulacije pelvičkog nerva štakora i izaziva pojačane mikcione kon-



Sl. 1. — Kontrakcije izoliranih inerviranih organa miša pod uticajem električne stimulacije pripadajućih nerava. Kod znaka Δ cyc dodat je Penitrem A 2 $\mu\text{g/ml}$. Kod znaka ∇ ispiranje posude. Kod znaka Δ S dodato je otapalo
MMK je mokraćni mjehur, MDK je duktus diferens, a MEK je egozagus

trakcije mokraćnog mjehura štakora. Promjena tonusa je slična promjenama mikcionih kontrakcija, tj. tonus mokraćnog mjehura štakora je povećan, a miša smanjen (Sl. 1).

Penitrem A u većim koncentracijama 20 $\mu\text{g/ml}$ prvo izaziva povećanje, pa smanjenje mikcionih kontrakcija izoliranog mokraćnog mjehura štakora



Sl. 2. — Kontrakcije izoliranih organa štakora pod uticajem električne stimulacije nerava. Kod znaka Δ cyc dodat je Penitrem A 2 $\mu\text{g/ml}$. Kod znaka ∇ ispiranje posude, a kod znaka Δ S dodato je otapalo

MMK je mokraćni mjehur, MDK je duktus deferens a MEK je ezofagus i miša, dakle djeluje dvofazno. Nakon ispiranja neuromikotoksina efekt stimulacije nerva ne vraća se u roku od jednog sata na kontrolne vrijednosti, što znači da mu je djelovanje dugotrajno i ireverzibilno.

Djelovanja penitrema A na duktus deferensu

Mikoneurotoksin penitrem A djeluje smanjujući efekt adrenergičnog nerva duktus deferensa miša, a povećava efekt stimulacije istog hipogastričkog nerva duktus deferensa štakora (sl. 1 i 2). U većem broju eksperimenata penitrem A djeluje dvofazno — prvo povećá, pa smanji efekt stimulacije. U 18/27 eksperimenata sa duktus deferensom miša nađeno je smanjenje efekta stimulacije nerva, u samo u 3 od 27 je smanjen tonus. Penitrem A u većim koncentracijama, 20 $\mu\text{g/ml}$, snažno povećava efekte stimulacije hipogastričkog nerva duktus deferensa štakora.

Djelovanje penitrema A na ezofagusu

Penitrem A u koncentraciji 2 $\mu\text{g/ml}$ povećava efekte stimulacije somatskog nerva ezofagusa miša u 6/27 slučajeva, a štakora u 2 od 13 slučajeva. U većim koncentracijama 20 $\mu\text{g/ml}$ efekt povećanja je izrazitiji nego sa manjim koncentracijama.

DISKUSIJA

Kao što se vidi na tabeli 1, mikoneurotoksin penitrem A izaziva povećanje efekta stimulacije i povećanje tonusa na sva tri organa uzeta od štakora. Efekt stimulacije nerava povećan je na mokraćnom mjehuru u 4/11, duktus deferensu 4/14 i ezofagusu 2 od 13. Za razliku od djelovanja penitrema A na organe štakora, na organima miša registrovano je smanjenje efekta stimulacije holinergičnih i adrenergičnih autonomnih nerava. Smanjene su mikcione kontrakcije u 8/16 i kontrakcije duktus deferens u 8/27. Jedini izuzetak na organima miša je ezofagus, čije se kontrakcije povećavaju pod uticajem penitrema A.

Tabela 1.

POVEĆANJE ILI SMANJENJE EFEKTA STIMULACIJE NERAVA POD UTICAJEM PENITREMA 2 $\mu\text{g/ml}$

		POVEĆANJE		SMANJENJE	
		Štakor	Miš	Štakor	Miš
Mokraćni mjehur	Kontrakcije	4/11	—	—	8/16
	Tonus	4/11	—	—	5/16
Duktus deferens	Kontrakcije	4/14	—	—	8/17
	Tonus	2/14	—	—	3/27
Ezofagus	Kontrakcije	2/13	6/27	—	—
	Tonus	3/13	—	—	6/27

Wilson i sar. (1972) analizirali su na izoliranoj hemidijafragmi štakora uticaj penitrema A na neuromuskularnu vezu. Našli su da penitrem A djeluje na pre — i postsinaptička mjesta, povećavajući oslobađanje acetilholina, kao i osjetljivost postsinaptičke membrane. Povećana frekvencija MEPP ukazuje na facilitaciju spontanog oslobađanja paketića acetilholina, a povećana amplituda može biti zbog povećanja paketića i povećanja osjetljivosti acetilinskog receptora na paketiće normalne veličine. U ovom eksperimentu, gdje je analizirana promjena motiliteta, analogan je ezofagus sa svojim reakcijama hemidijafragmi štakora. Povećanje efekta stimulacije visine kontrakcija, kao i tonusa, ukazuje na spontano oslobađanje acetilholina iz somatskog ezofagealnog nerva. Povećanja efekta stimulacije nađeno je kod obje vrste životinja.

Za razliku od saglasnosti sa elektrofiziološkim rezultatima na obje vrste životinja, ne postoji analogija između djelovanja penitrema A na autonomne nerve i autonomne organe. Karakteristično je da su mikcione kontrakcije izazvane holinergičkim nervima i kontrakcije duktus deferensa izazvane stimulacijom adrenergičkih nerava smanjene kod miša, a povećane kod štakora. Vrlo je vjerovatno da penitrem A djeluje različito kod miša u odnosu na organe štakora i da im je različit mehanizam djelovanja. U većim koncentracijama penitrem A djeluje na štakora dvofazno, prvo povećava, a zatim smanjuje efekt stimulacije nerava. Mora se napomenuti da je penitrem A vrlo slabo topiv u otopini u kojoj se suspendiraju organi sa pripadajućim nervima. Uticaj otapala, propilen glikola, u nekim je eksperimentima istog pravca kao uticaj penitrema A, pa je vrlo teško odvojiti pravi uticaj mikon-neurotoksina.

Mikonnurotoksin penitrem A u malim koncentracijama izaziva efekte na izolirane inervirane organe (Wilson, 1971). Efekt zavisi od koncentracije i vrste životinja. U većini slučajeva na izolirane organe štakora djeluje na taj način što povećava efekt stimulacije somatskih i autonomnih nerava, dok se njegovo djelovanje na organe miša ogleda u smanjenju efekta pomenutih nerava. Izuzetak je ezofagus, jer u oba slučaja dolazi do povećanja efekta stimulacije. Zbog vrlo slabe topivosti penitrema A, upotreba propilen glikola kao otapala maskira djelovanje neuromikotoksina.

HUKOVIĆ, S., GRINFELD, B. and SERDAREVIĆ, DŽ.

THE EFFECT OF MYCOTOXINS ON NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

SUMMARY

On the three isolated innervated organs with accessory nerves the effect of neuromycotoxin is analysed.

Neurotoxin Penitrem A increases the effect of stimulation of oesophageal nerves which are cholinergic somatic nerves. The oesophagus is prepared of rats or mice. Penitrem A decreases the effect of electrical stimulation of-

autonomic cholinergic and adrenergic nerves of mice, but increases the effect of the some nerves of rats. Recordet differences of the species suggested different mechanism and site of actions of neuromycotoxin Penitrem A.

The urinary bladder is prepared with cholinergic pelvic nerve and the vas deferens is prepared with adrenergic hypogastric nerve.

BIBLIOGRAFIJA

- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Wells, J. M. (1974): *A new tremorgenic metabolite from Penicilium paxilli*. Can. J. Microbiol. 20, 1159—1162.
- Huković, S. (1961): *Responses of the isolated sympathetic nerveductus deferens preparation of the guinea-pig*. Brit. J. Pharmacol. 16, 188—194.
- Huković, S., Rand, M. J. and Vanov, S. (1965): *Observations on an isolated, innervated preparation of rat urinary bladder*. Brit. J. Pharmacol. 24, 178—188.
- Huković, S. und Stern, P. (1966): *Prufung der Botulinus-Toxin-Wirkung am in vivo vergifteten isolierten innervierten Oesophagus der Maus*. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path. 254, 401—405.
- Lindner, E. (1974): *Toxikologie der Nahrungsmittel*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ožegović, L. (1971): *Mikoze i mikotoksikoze domaćih životinja*. Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo.
- Sapeika, N. D. (1974): *Farmacologia e tossicologia degli alimenti*. Tamburini Editore, Milano.
- Stern, P. (1971): *Pharmacological analysis of the tremor induced by cyclopium toxin*. Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta 7, 187—196.
- Wilson, B. J., Wilson, C. H., Hayes, A. W. (1968): *Tremorgenic toxin from Penicillium cyclopium grown on food materials*. Nature (Lond.) 220, 77.
- Wilson, B. J. (1971): *Miscellaneous Penicillium Toxins*. Microbial Toxins, 6, 459—521.
- Wilson, B. J., Hoekman, T., Dettbarn, W. D. (1972): *Effect of a fungus tremorgenic toxin (penitrem A) on transmission in rat phrenic nerve-diaphragm preparations*. Brain Research 40, 540—544.